

龙亚飞,王 啸,邱树毅. 农用多抗霉素对不同地域莱氏野村菌的抑制效果[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):144-146.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.049

农用多抗霉素对不同地域莱氏野村菌的抑制效果

龙亚飞¹, 王 啸^{1,2,3}, 邱树毅^{1,3}, 王嘉福²

(1. 贵州大学贵州省发酵工程与生物制药重点实验室, 贵州贵阳 550025;

2. 贵州大学精细化工研究开发中心/绿色农药与农业生物工程教育部重点实验室, 贵州贵阳 550025;

3. 贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵州贵阳 550025)

摘要:为研究农用多抗霉素对来自山东、安徽、河南的 3 株莱氏野村菌的抑菌效果。采用生长速率法测定多抗霉素对莱氏野村菌的 EC₅₀ 值,并通过 EC₅₀ 值进行抑菌效果对比。结果表明:多抗霉素对 3 株莱氏野村菌都有抑制效果,其中对来自山东的莱氏野村菌 Nr13 的抑制效果最佳,EC₅₀ 值为 0.437 7 mg/mL。

关键词:生物农药;莱氏野村菌;多抗霉素;生长速率法;抑菌效果;耐药性

中图分类号: S482.2*8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)01-0144-02

长期、大量施用化学杀菌剂不仅会破坏生态环境,而且还会使病原菌产生抗药性,降低防治效果,因此关于生物防治的研究引起了人们的广泛关注^[1-2]。多抗霉素是一种广谱抗生素,能干扰真菌细胞壁几丁质的生物合成^[3],从而抑制真菌生长;主要用于防治烟草赤星病、苹果斑点落叶病及番茄叶霉病等多种真菌病害。莱氏野村菌(*Nomuraea rileyi*, 简称 Nr)为昆虫的重要病原真菌^[4]。在研究化学农药对虫生真菌菌丝生长、分生孢子萌发及分生孢子产生量时发现,虫生真菌与杀虫剂的相容性优于杀菌剂^[5]。谭可欣用病原真菌菌块进行抑菌试验,结果表明,新多抗霉素对烟草赤星病菌、苹果斑点落叶病菌都具有很强的抑菌活性,其 EC₅₀ 值分别为 0.39、0.43 mg/L^[6];奉代力等采用生长速率法测得 10% 多抗霉素 B 可湿性粉剂对番茄灰霉病菌的 EC₅₀ 值为 6.32 mg/L^[7];蒋婧婧通过对莱氏野村菌分生孢子的抑制性试验,筛选出 2 种药物对莱氏野村菌的最佳抑制浓度,其中潮霉素 B 的最佳抑制浓度为 80 μg/mL,苯菌灵的最佳抑制浓度为 2 μg/mL^[8]。姜兴印采用孢子萌发法和生长速率法分别测定试验药剂对 15 个木霉菌株的抗性水平,求出每种药剂对不同木霉的毒力 EC₅₀ 值,通过 EC₅₀ 值比较不同木霉菌株对试验药剂的抗性程度^[9]。

由于目前对莱氏野村菌耐农用抗生素多抗霉素的研究较少,因此本研究采用菌丝生长速率法研究农用多抗霉素对不同地域莱氏野村菌的抑菌效果,筛选出耐多抗霉素的莱氏野村菌,这样多抗霉素可以杀死其他真菌而使莱氏野村菌不受影响,多抗霉素和莱氏野村菌孢子复配后施用可以实现同时杀菌杀虫的目的,从而减少化学农药的使用量,缓解化学防治对环境的压力。

收稿日期:2014-08-30

基金项目:贵州省科学技术基金(编号:黔科合 J 字[2012]2101 号)。
作者简介:龙亚飞(1987—),女,穿青族,贵州毕节人,硕士,主要从事发酵与制药的研究。E-mail:1067724485@qq.com。

通信作者:王 啸,副教授,主要从事农药学的研究。E-mail:wang-zhi8903@126.com。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试菌株由 Nr13、Nr19、Nr41 安徽农业大学虫生真菌菌种保藏库提供,由贵州大学贵州省发酵工程与生物制药重点实验室保藏,具体情况见表 1。

表 1 供试菌株的寄主及来源

菌株代号	寄主	来源地
Nr13	菜粉蝶 (<i>Pieris rapae</i>)	山东平阴孝直
Nr19	小菜蛾 (<i>Plutella xylostella</i>)	安徽繁昌
Nr41	鳞翅目 (<i>Lepidoptera</i>) 幼虫	河南南阳

1.2 供试药剂

供试药剂为 3% 多抗霉素水剂(安徽省绩溪县农华生物科技有限公司)。

1.3 供试培养基及菌株预培养

萨氏麦芽酵母膏(SMAY)培养基:40 g 麦芽糖、10 g 蛋白胨、20 g 酵母膏、20 g 琼脂,蒸馏水 1 000 mL。用含 0.05% 吐温-80 的无菌水配制一定浓度的莱氏野村菌孢子悬液,将其涂布于 SMAY 培养基上,25 ℃ 下光照培养 5~6 d,待菌落边缘长大量菌丝而没有产孢时,即可用于试验。

1.4 方法

采用生长速率法测定抑菌效果^[10-11]。根据 3% 多抗霉素在田间施用时的稀释剂量,将药剂配制成 0.6、1.2、1.5、2.3 mg/mL 等 5 个浓度梯度。在无菌条件下,用无菌水将多抗霉素分别稀释 1.5、2.0、2.5、5.0、10.0 倍。随后用移液枪吸取 10 mL 药液加入含 90 mL 冷却至 50 ℃ 左右的 SMAY 培养基的三角瓶里,充分摇匀后迅速倒入 4 个灭菌培养皿(直径为 9 cm)中,制成各系列浓度的含药 SMAY 培养基平板,以含等量无菌水的 SMAY 培养基平板为对照;待凝固后,用打孔器(直径 5 mm)打取生长整齐一致的菌饼,菌丝面朝上接种于各含药培养基中央。25 ℃ 光照培养 10 d,用十字交叉法测定各处理的菌落直径,3 次重复,取平均数,计算相对抑制率。

抑制率 = $\frac{(A - C) - (B - C)}{A - C} \times 100\%$ 。

式中:A 表示对照菌落直径,mm;B 表示原菌直径,mm;C 表示处理菌落直径,mm。

1.5 数据处理

用 Excel 对数据进行统计分析^[12],以试验中设定的浓度对数为横坐标(*x*),抑制率的概率为纵坐标(*y*),确定各药剂对病菌的毒力回归方程 $y = ax + b$ 、相关系数 *r* 以及有效抑制中浓度(EC₅₀)。

2 结果与分析

2.1 供试多抗霉素对不同地域莱氏野村菌的抑制作用

从表 2 可以看出,来自河南的莱氏野村菌 Nr41 对 3% 多抗霉素耐药性最强,在浓度为 3 mg/mL 时,抑菌率为 67.3%;在浓度 ≤ 1.2 mg/mL 时,抑制率低于 50%。在浓度为 3 mg/mL 时,来自山东和安徽的莱氏野村菌 Nr13 和 Nr19 抑制率较高,分别为 87.3%、88.5%,其中来自安徽的 Nr19 几乎没有生长。随处理浓度的降低,其对 3 株莱氏野村菌的抑制作用减弱。

2.2 供试多抗霉素对不同地域莱氏野村菌的毒力测试结果

表 2 多抗霉素对 3 株莱氏野村菌的抑制作用

处理浓度 (mg/mL)	Nr13		Nr19		Nr41	
	处理直 径(mm)	抑菌率 (%)	处理直 径(mm)	抑菌率 (%)	处理直 径(mm)	抑菌率 (%)
3.0	1.15	87.3a	0.80	88.5a	5.2	67.3a
2.0	1.85	79.6a	1.20	82.7b	5.8	63.5a
1.5	2.15	76.2a	1.50	78.4b	7.2	54.7a
1.2	3.20	64.6b	2.70	61.2b	8.1	49.1a
0.6	3.85	57.5c	3.25	53.2c	9.2	42.1a
空白	9.05		6.95		15.9	

注:同列数据后不同字母表示在 0.05 水平差异显著。

试验中采用生长速率法测定 3% 多抗霉素对不同地域的 3 株莱氏野村菌 Nr13(山东)、Nr19(安徽)和 Nr41(河南)的抑菌活性,结果见表 3,其中杀菌剂对病菌的 EC₅₀ 代表杀菌剂对病菌抑菌活性的高低^[12]。由表 3 可知,来自河南的莱氏野村菌 Nr41 对 3% 多抗霉素的耐药性最强,其 EC₅₀ 值为 1.054 0 mg/mL;其次是来自安徽的 Nr19,其 EC₅₀ 值为 0.554 4 mg/mL;耐药性最弱的是来自山东的 Nr13,其 EC₅₀ 值为 0.437 7 mg/mL。

表 3 多抗霉素对 3 株莱氏野村菌的耐药性

菌株	菌株来源地	毒力回归方程	相关系数 <i>r</i>	EC ₅₀ (mg/mL)	EC ₉₀ (mg/mL)
Nr13	山东平阴孝直	$y = 0.443\ 9x + 0.658\ 3$	0.972 2	0.437 7	3.503 4
Nr19	安徽繁昌	$y = 0.544\ 9x + 0.639\ 6$	0.951 9	0.554 4	3.005 3
Nr41	河南南阳	$y = 0.384\ 0x + 0.491\ 1$	0.974 4	1.054 0	11.610 3

3 结论与讨论

近年来,生防制剂作为有害生物综合治理(integrated pest management,简称 IPM)的重要组成部分,在农业生产中发挥着越来越重要的作用。丁子香酚、多抗霉素 B、枯草芽孢杆菌和木霉菌均属于生物杀菌剂,对人畜安全,对自然环境安全、无污染,病原菌不易产生抗药性等^[13-15]。本研究结果表明,3% 多抗霉素对不同地域的莱氏野村菌 Nr13(山东)、Nr19(安徽)和 Nr41(河南)都具有抑制活性。但 3% 多抗霉素对这 3 株莱氏野村菌的抑制效果均表现出一定的差异性,其中对来自河南的 Nr41 耐药性最佳,其 EC₅₀ 值为 1.054 0 mg/mL,这对筛选具有耐药性的莱氏野村菌菌株具有一定的参考意义。本研究中多抗霉素对莱氏野村菌的 EC₅₀ 值为 0.437 7 ~ 1.054 0 mg/mL。刘保友采用菌丝生长速率法测定苹果斑点落叶病菌对多抗霉素的敏感性,结果表明,多抗霉素对多数苹果斑点落叶病病菌的菌丝生长具有良好的抑制效果,EC₅₀ 值为 4.165 5 ~ 103.462 1 mg/mL^[16]。奉代力等采用生长速率法测定 10% 多抗霉素 B 可湿性粉剂对番茄灰霉病菌的 EC₅₀ 值为 6.32 mg/L^[7]。张亚等采用菌丝生长抑制法对烟草赤星病进行室内毒力测定,结果表明,3% 多抗霉素对烟草赤星病的 EC₅₀ 值为 0.383 5 mg/mL^[17]。可见,多抗霉素对苹果斑点落叶病、番茄灰霉病和烟草赤星病的 EC₅₀ 值都小于其对莱氏野村菌的 EC₅₀ 值,因此,农用抗生素多抗霉素和莱氏野村菌孢子复配使用时,在一定浓度下,多抗霉素可以杀死其他真

菌,而莱氏野村菌不受影响,这样杀虫毒力强^[4]的莱氏野村菌可以寄生在害虫体内,至其死亡,实现同时杀菌杀虫的目的,从而减少化学农药的使用量,缓解化学防治对环境的压力;同时为控制江苏省烟草、番茄等农作物的主要害虫和真菌病害,促进生态农业发展提供必要的技术支撑。

参考文献:

[1]罗 宽,王 庄. 利用拮抗的 *Pseudomonas* spp. 和无致病力的 *P. solanacearum* 防治青枯病的研究[J]. 植物病理学报,1983,13(1):51-56.
[2]Wilcox W F, Harman G E. Control of *Phytophthora* root rots of soybeans and raspberries with *Trichoderma* and *Glucoladium* spp. [J]. Petria,1991,1:140-144.
[3]宋宝安. 新杂环农药:杀菌剂卷[M]. 北京:化学工业出版社,2008:432.
[4]裴维蕃,余永年,卯晓岚,等. 菌物学大全[M]. 北京:科学出版社,1998:960-961.
[5]齐永霞. 白僵菌和绿僵菌在植物根际的定殖及对几种土传植物病原真菌的抑制作用研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2011:49.
[6]谭可欣. 新多氧霉素的生产与应用研究[D]. 武汉:华中农业大学,2005:32-34.
[7]奉代力,王 强,郑纪慈,等. 几种杀菌剂对番茄灰霉病菌的抑菌效果对比研究[J]. 浙江农业学报,2013,25(1):119-123.
[8]蒋婧婧. 莱氏野村菌遗传转化体系的构建[D]. 合肥:安徽农业大学,2010:34-35.

刘丽华,王 双,关 磊. 北乌头乙醇提取液对菜青虫体内保护酶活性的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):146-147.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.050

北乌头乙醇提取液对菜青虫体内保护酶活性的影响

刘丽华,王 双,关 磊

(通化师范学院生物系,吉林通化 134002)

摘要:为探讨北乌头的杀虫作用机理,采用分光光度法测定了北乌头乙醇提取液对菜青虫体内保护酶活性的影响。由结果可知,用北乌头乙醇提取液处理菜青虫后,其体内 SOD 和 CAT 酶活性呈现先升高后降低的趋势,都在 24 h 时达到高峰,而 POD 酶活性则表现为先下降后上升再下降的趋势;在处理 36 h 前,3 种保护酶处理组都高于对照组,48 h 后,均低于对照组。结果说明,北乌头乙醇提取液能有效干扰昆虫体内保护酶系,扰乱其正常的生理代谢,从而起到防治效果。

关键词:北乌头;菜青虫;保护酶

中图分类号:S482.3+9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)01-0146-02

菜青虫是菜粉蝶(*Pieris rapae* L.)的幼虫,属鳞翅目粉蝶科,是十字花科植物的重要害虫,除食叶危害外,还可导致软腐病的发生,危害十分严重。长期以来,对其防治都以化学农药为主,但由于化学农药的毒性、残留及抗性等,带来了一系列社会和生态问题。因此,创制新型、高效、低毒杀虫剂备受人们重视,特别是利用天然植物活性成分制作杀虫剂更是引人注目。开发植物源农药是现代农药研究的一个重要发展方向。

北乌头为毛茛科乌头属多年生草本植物,多分布在我国的东北及华北地区,其块根具有镇痛、镇痉、祛风湿和解热等作用,是一类具有广阔开发前景的重要植物资源。除广泛应用于医学外,已有将其应用于防治植物害虫的报道^[1-4]。

研究表明,昆虫与其他生物一样,体内存在着自由基,其中超氧自由基具有很强的氧化能力,对许多生物功能分子具有破坏作用。但在正常情况下,昆虫体内存在超氧化物歧化酶(superoxide, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)等保护酶系,三者协同作用,使自由基保持在一个较低的水平,从而维持昆虫体内正常的生理活

动^[5-7]。近年来,有关昆虫保护酶的研究报道很多,但多数集中在化学农药抗性、病原微生物与昆虫保护酶之间的研究,而关于利用天然植物活性成分对菜青虫体内保护酶活性变化的研究还未见报道。为探讨北乌头对菜青虫杀虫作用机理,笔者研究了用北乌头乙醇提取液处理菜青虫后,其体内保护酶的活性变化规律,以期与研究及开发新的植物型杀虫剂及作用机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

北乌头采自长白山区。菜青虫成虫从通化师范学院生物系植物园中采回,在实验室内饲养,让其产卵于白菜苗上,选择生长状态良好、整齐一致的 4 龄幼虫进行试验。

1.2 试虫处理

将新鲜幼嫩白菜叶分别浸泡于用乙醇提取的质量浓度为 30 mg/L 的北乌头块根粗提液(试验组)和清水(对照组)中,3 s 后取出晾干,分别饲喂菜青虫。每 8 h 测定 1 次 POD、SOD、CAT 的活性。每处理 10 头幼虫,重复 3 次。

1.3 保护酶活性测定方法

1.3.1 酶液制备 将预先处理好的试虫置于预冷的研钵中,加入 PBS(磷酸盐缓冲液,0.05 mol/L, pH 值 7.0)和少许石英砂,在冰浴下研磨成匀浆,4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min,上清液即为酶液,贮于 4 ℃下备用。

1.3.2 SOD 酶活力测定 采用氮蓝四唑光化学还原法^[8]

学出版社,2007。

[14]高立起,孙 阁. 生物农药集锦[M]. 北京:中国农业出版社,2009。

[15]胡永红,曹 峥,杨文革,等. 多效霉素研究进展[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):1-4。

[16]刘保友,王英姿,张 伟,等. 苹果斑点落叶病菌对多抗毒素的抗药性及其地理分布[J]. 中国果树,2013(4):49-51。

[17]张 亚,何可佳,刘 薇,等. 几种药剂防治烟草赤星病的药效试验[J]. 烟草科技,2009(10):61-64。

收稿日期:2014-03-15

基金项目:吉林省科技项目(编号:20130101100JC);吉林省教育厅项目(编号:2013493)。

作者简介:刘丽华(1972—),女,吉林通化人,博士,副教授,主要从事动物资源与功能基因组研究。Tel: (0435) 3208073; E-mail: liulihua209@163.com。

[9]姜兴印. 抗药木霉菌高效生防菌株生物学及其制剂加工技术[D]. 泰安:山东农业大学,2006:17-68。

[10]孙广宇,宗兆锋. 植物病理学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社,2002。

[11]NY/T 1156.2-2006 农药室内生物测定试验准则 杀菌剂第 2 部分:抑制病原真菌菌丝生长试验平皿法[S]。

[12]奉代力,王 强,陈丽萍,等. 2 种常见番茄致病真菌对几种杀菌剂的敏感性测定[J]. 中国农学通报,2013,29(16):96-99。

[13]魏艳敏. 生物农药及其应用技术问答[M]. 北京:中国农业大